

УДК 577.212.3:595.789

НОВИЙ СТРУКТУРНИЙ ПІДКЛАС 5S РИБОСОМНОЇ ДНК *LYCAENA TITYRUS*

О.В. ЧЕРЕВАТОВ, А.П. СТАТНА, Р.А. ВОЛКОВ

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича
Україна, 58012, м. Чернівці, вул. Коцюбинського, 2
e-mail: ra.volkov@gmail.com

Мета. 5S рДНК відноситься до класу помірно повторюваних послідовностей, які організовані у вигляді тандемно повторюваних ділянок. Кожна повторювана одиниця складається з консервативної 5S рРНК кодуючої ділянки і мінливого міжгенного спейсера (МГС), який широко використовується для молекулярної систематики. Тим не менше, організація і еволюція 5S рДНК *Lepidoptera* досі залишається погано вивченою. Мета дослідження полягала в тому, щоб описати молекулярну організацію 5S рДНК *Lycaena tityrus*. **Методи.** Повторювані одиниці 5S рДНК були ампліфіковані за допомогою ПЛР, клоновані в бактеріальний вектор і сиквензовані. **Результати.** Було показано, що МГС з 5S рДНК *L. tityrus* має довжину 60–61 нп і демонструє низький рівень подібності порівняно із попередньо сиквендованими послідовностями МГС інших видів метеликів. Таким чином, повторювана послідовність 5S рДНК *L. tityrus* належить до нового структурного підкласу *Ms*.

Ключові слова: *Lycaena*, *Lepidoptera*, 5S рДНК, молекулярна еволюція та таксономія.

Вступ. Повторювані послідовності є важливим структурним компонентом геному еукаріот. Вони також привертають увагу при вивченні закономірностей молекулярної еволюції та використовуються як інструмент у молекулярній систематиці. Зокрема, за останні роки для таксономії метеликів як молекулярні маркери почали використовувати 5S рДНК, тобто ділянки геному, що кодують 5S рРНК. 5S рРНК є обов'язковим компонентом рибосоми. Відповідно, ділянки, що її кодують, присутні в геномах усіх клітинних організмів. 5S рДНК еукаріот відноситься до класу тандемно організованих помірно повторюваних послідовностей, що розташовані у вигляді кластерів в одному або декількох хромосомних локусах. Кожна повторювана одиниця 5S рДНК складається із кодуючої ділянки та міжгенного спейсера (МГС). Організація 5S рДНК добре вивчена у рослин [1–3], де цю ділянку геному широко використовують у молекулярній таксономії. Є також відомості про організацію 5S рДНК хребетних тварин [4]. Проте у безхребетних, зокрема у комах, 5S рДНК все ще залишається практично недослідженою. У метеликів (*Lepidoptera*) організація 5S рДНК була раніше вивчена лише для шовковичного шовкопряду (*Bombyx mori*) [5]. Попередні дослідження нашої лабораторії виявили суттєву мінливість 5S рДНК у представників різних родин *Lepidoptera* [6, 7], що вказує на необхідність детальнішого вивчення організації та еволюції цієї ділянки геному у лускокрилих.

Родина *Lycaenidae*, до якої входить більше ніж 3500 видів, є однією з найбільших серед булавовусих лускокрилих. Рід *Lycaena* нараховує 6 підродів, з

© О.В. ЧЕРЕВАТОВ, А.П. СТАТНА, Р.А. ВОЛКОВ, 2012

яких в Європі зустрічається приблизно 11 видів [8]. Для видів цього роду характерна висока фенотипова мінливість, що робить їх цікавим об'єктом для вивчення процесів мікроеволюції. В останні десятиліття представники ряду інтенсивно досліджуються, зокрема і на молекулярному рівні [9 – 11].

Близькоспоріднені роди *Lycaena* та *Polyommatus* можуть бути використані як моделі для вивчення закономірностей молекулярної еволюції окремих генів і мультигенних родин, визначення філогенетичних зв'язків між видами. У представленій роботі наведено результати аналізу молекулярної організації 5S рДНК дукачика бурого (*Lycaena tityrus* Poda, 1761) та обговорюються можливі механізми молекулярної еволюції 5S рДНК лускокрилих родів *Lycaena* і *Polyommatus*.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження були метелики виду *Lycaena tityrus*. Загальну ДНК екстрагували з тіла метелика згідно із стандартним протоколом з використанням в якості детергенту додецилсульфату натрію [12, 13].

Для ампліфікації повторюваної ділянки 5S рДНК методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) використовували пару праймерів RV0803 (5'-CATAGCGGCCGCGTGGTCACTTTGGATGGGTGA-3') та RV0902 (5'-GATCGCGGCCGCCGTGTTTTAATGTGGTATGGACGTTG-3'), які було розроблено нами раніше [6]. Ці праймери є комплементарними до різних частин ділянки, що кодує 5S рРНК у декількох видів членистоногих, та містять на 5'-кінці додатковий сайт впізнавання рестриктази *NotI* (GCGGCCGC), який використовували для клонування ПЛР-продуктів. Місце посадки праймерів було обрано так, щоб досягти ампліфікації повного МГС та фрагментів кодуючих ділянок, що межують із ним, окрім частини кодуючої ділянки між 5'-кінцями використаних праймерів (рису-

нок). Згідно з розрахунками для пари праймерів RV0803+RV0902 розмір фрагмента, який має залишатися неампліфікованим, становить 39 нп.

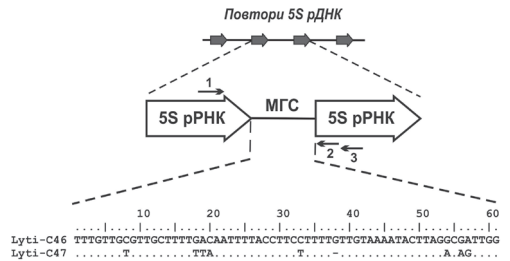


Рисунок. Порівняння первинної нуклеотидної послідовності МГС клонів Мс варіанта 5S рДНК. Для розрахунків було застосовано програму Megalign 7.1.0. (Clustal V: Gap penalty = 10; gap length penalty = 10). Стрілками вказано розташування праймерів RV0803 (1), RV0902 (2) та RV0804 (3), використаних для ампліфікації 5S рДНК метеликів у цій та попередніх роботах (див. табл. 2)

Кількість ДНК для проведення ПЛР складала 50 нг на реакцію. Ампліфікацію ДНК проводили в середовищі такого складу: 1×буфер для ПЛР (Fermentas, Литва), $MgCl_2$ – 2 мМ, суміш dNTP – 0,2 мМ кожного, праймери – 1 мМ кожного, ДНК-полімераза (DreamTaq, Fermentas) – 1 од. активності на реакцію. Загальний об'єм реакційної суміші складав 20 мкл. ПЛР проводили з використанням приладу MiniCycler (MJ Research Inc, США) за такою програмою: (1) початкова активація ДНК-полімерази – 95 °C, 10 хв.; (2) денатурація ДНК – 94 °C, 45 с; (3) гібридизація праймерів – 55 °C, 1 хв.; (4) синтез ДНК – 72 °C, 2 хв.; (5) закінчення ампліфікації – 72 °C, 8 хв.; (6) припинення реакції – 4 °C. Загальна кількість циклів ампліфікації – 32. Для аналізу результатів ПЛР використовували електрофорез у 2% агарозному гелі.

Отримані ПЛР-продукти обробляли рестриктазою *NotI* та лігували по комплементарних липких кінцях у сайт *Eco52I* плазміди pLitmus 38 із використанням Т4 ДНК-лігази (Fermentas). Трансформацію

компетентних клітин лінії *Escherichia coli* XL-blue проводили методом електропорації з використанням приладу E. coli Pulser (BioRad, США). Присутність вставки у складі рекомбінантних плазмід перевіряли методом *blue-white colony selection* та підтверджували рестриктазним картуванням. Плазмідиди виділяли методом лужного лізису [12, 13]. Ферментативні реакції проводили згідно з рекомендаціями фірми-постачальника.

Вставки 5S рДНК відібраних клонів сиквенували з використанням Big Due Terminator Cycle Sequencing Kit на сиквенаторі ABI Prism 310 (PE Applied Biosystems, США). Первинну обробку та аналіз отриманої первинної нуклеотидної послідовності проводили за допомогою комп'ютерної програми Chromas та пакету програм комп'ютерної обробки даних DNASTAR [14]. Пошук послідовностей у Genbank здійснювали за допомогою програми BLAST [15].

Результати та обговорення

Електрофоретичне розділення отриманих продуктів ПЛР показало, що ампліфікація повторюваної ділянки 5S рДНК *L. tityrus* призводить до утворення фрагмента ДНК довжиною близько 200 нп. Отримані ПЛР-продукти було клоновано у бактеріальний вектор.

За результатами скринінгу було ідентифіковано сім колоній трансформантів білого кольору, з яких було виділено плазмідиди для подальшого картування. Обробка цих плазмідид рестриктазою *Eco52 I* призводила до утворення двох фрагментів ДНК. Фрагмент більшої довжини в усіх плазмідид мав розмір приблизно 2800–2900 нп, що відповідає розміру векторної плазмідиди рLitmus 38, тоді як фрагмент меншої довжини, який відповідає вставці, мав розмір приблизно 200 нп, що збігається із довжиною ПЛР-продуктів, які було використано для клонування. На загал було ідентифіко-

вано чотири рекомбінантні плазмідиди, що містили вставку довжиною близько 200 нп, дві з яких (рLyti-C46, -C47) було використано для подальшого сиквенування.

Аналіз отриманих результатів показав, що вставки двох сиквенуваннями нами плазмідид містять на обох кінцях послідовності праймерів, використаних при проведенні ПЛР. Для визначення границь між кодуючою ділянкою та МГС отримані послідовності було порівняно із послідовністю 5S рДНК шовкопряда *B. mori* (єдиного виду метеликів, для якого на сьогодні у базі даних Genbank наявна послідовність повного повтору 5S рДНК – реєстраційний номер L00335 [5]) та із послідовностями 5S рДНК *Philosamia cynthia* (K02354, X13039 [16, 17]) та *Antheraea pernyi* (X13035, X13036 [16]). Встановлено, що вставки в обох сиквенуваннями клонах містять по краях фрагменти кодуючої ділянки розміром 53 нп (враховуючи послідовність праймера RV0803) та 28 нп (враховуючи послідовність праймера RV0902 – див. рис.). Довжина МГС 5S рДНК, присутніх у клонах рLyti-C46 і -C47, становить, відповідно, 61 та 60 нп.

Порівняння отриманих сиквенсів показало, що у ампліфікованих фрагментах кодуючої ділянки різниця між аналізованими послідовностями відсутня, тоді як у МГС було знайдено вісім точкових замін, що відрізняють їх один від одного. Із цих восьми замін п'ять є транзиціями (С→Т або G→A), які ймовірно виникли внаслідок дезамінування 5-метилцитозину. Решта три заміни знаходяться в одному місці та є трансверсіями, дві з яких (ТТ→GA) могли виникнути як результат репаративного синтезу ДНК у місці утворення тимідинового димеру за дії ультрафіолетового опромінення. Крім того, МГС клону рLyti-C47 відрізняється від рLyti-C46 делецією 1 нп у 38 позиції (рисунок). Виходячи з результатів вирівнювання було встановлено, що рівень подібності між собою послідовностей МГС

клонів pLyti-C46 і -C47 *L. tityrus* становить 76,7%.

Раніше нами було показано, що в геномах різних видів метеликів присутні варіанти повторів 5S рДНК, що відрізняються довжиною повторюваної ділянки, та запропоновано відповідну класифікацію 5S рДНК [18] (табл. 1). Згідно з цією класифікацією просиквеновані повтори 5S рДНК *L. tityrus* належать до структурного класу М. У свою чергу в межах цього класу нами раніше ідентифіковано два структурних підкласи Ма і Mb, які відрізняються між собою за довжиною та по послідовності. Так, довжина МГС для Ма-варіанта становить 123–125 нп, а у Mb варіанта – 78–82 нп (табл. 2). Відповідно, для з'ясування приналежності клонуваних повторів 5S рДНК *L. tityrus* до певного структурного підкласу, а також для виявлення особливостей цих послідовностей МГС нами було проведено їх порівняння із відомими на сьогодні послідовностями МГС інших видів лускокрилих.

Виявилося, що подібність в межах структурного підкласу Ма коливається від 82,3% до 100% (табл. 3). Нижчий рівень подібності спостерігається в межах підкласу Mb – 57,7–98,8%. Проте порівняння

підкласів між собою показує ще нижчий рівень гомології послідовностей, який знаходиться в межах 28,0–33,3%. Такий низький відсоток подібності практично не відрізняється від значень, які слід очікувати для випадкового збігу двох неспоріднених послідовностей.

Таблиця 1. Класифікація 5S рДНК метеликів за довжиною повторюваної ділянки [18]

Структурний клас		Довжина повторюваної ділянки, нп
скорочене позначення	назва	
S	короткий (short)	менше 140
M	середній (middle)	140–399
L	довгий (long)	400–800
XL	дуже довгий	більше 800

Порівняння послідовностей МГС клонів pLyti-C46 та -C47 виявило низьку гомологію із послідовностями, що належать як до підкласу Ма, так і Mb. Зокрема, подібність між МГС клонів Ма та pLyti-C46 і -C47 лежить в межах 27,9–35,0%, а між клонами Mb та pLyti-C46 і -C47 – 27,9–39,3%. Отже, подібність аналізованих клонів *L. tityrus* та сиквенованих нами раніше клонів інших видів знаходиться на такому рівні, який демонструють різні структурні підкла-

Таблиця 2. Характеристики клонів 5S рДНК, використаних для порівняльного аналізу послідовності МГС

Вид	Клон	Праймери, що використані для ПЛР	Довжина МГС, нп	Структурний підклас	№ публікації в списку літератури
<i>Lycaena tityrus</i>	pLyti-C46	RV0803-RV0902	61	Mc	НД*
	pLyti-C47	RV0803-RV0902	60	Mc	НД
<i>Polyommatus icarus</i>	pPoic-C10	RV0803-RV0804	123	Ma	[19]
	pPoic-C11	RV0803-RV0804	124	Ma	[19]
	pPoic-C18	RV0803-RV0804	124	Ma	[19]
	pPoic-C37	RV0803-RV0902	82	Mb	[19]
	pPoic-C38	RV0803-RV0902	82	Mb	[19]
<i>Melitaea trivia</i>	pMetr-C4	RV0803-RV0804	78	Mb	[7]
	pMetr-C8	RV0803-RV0804	125	Ma	[7]
	pMetr-C9	RV0803-RV0804	125	Ma	[7]
	pMetr-C12	RV0803-RV0804	125	Ma	[7]

Примітка: НД – нові дані (клони, інформація про які раніше не була опублікована).

Таблиця 3. Відсоток подібності МГС 5S рДНК деяких видів лускокрилих

1	2	3	4	5	6	7	8	9	Клон	Підклас
***	76.7	27.9	27.9	29.5	29.5	39.3	39.3	27.9	1: Lyti_C46	Mc
	***	35.0	35.0	31.7	31.7	35.0	35.0	31.7	2: Lyti_C47	Mc
		***	96.7	85.4	84.6	31.7	31.7	33.3	3: Poic_C10	Ma
			***	83.1	82.3	31.7	31.7	30.8	4: Poic_C11	Ma
				***	99.2	28.0	28.0	28.2	5: Metr_C8	Ma
					***	28.0	28.0	28.2	6: Metr_C9	Ma
						***	98.8	57.7	7: Poic_C37	Mb
							***	59.0	8: Poic_C38	Mb
								***	9: Metr_C4	Mb

Примітки. Для розрахунків було застосовано програму Megalign 7.1.0. (Clustal V; Gap penalty = 10; gap length penalty = 10). Характеристики використаних для порівняння клонів наведені у табл. 2.

си в межах класу М. Такі дані свідчать, що два клони *L. tityrus* належать до нового, третього структурного підкласу Mc, який знаходиться на однаковій генетичній відстані від класів Ma та Mb. Цей результат вказує, що види метеликів, які належать до споріднених родів (*Lycaena* та *Polyommatus*) однієї підродини (Lycaenidae), можуть суттєво відрізнятися за набором варіантів повторів 5S рДНК, що свідчить про стрибкоподібний характер еволюції цієї ділянки геному.

Висновки

Вперше проведено клонування та секвенування 5S рДНК *L. tityrus*. Порівняльний аналіз послідовності двох отриманих клонів та послідовностей 5S рДНК інших видів метеликів дозволяє стверджувати, що МГС 5S рДНК *L. tityrus* належить до нового, раніше не відомого структурного підкласу Mc.

Перелік літератури

1. Volkov R.A., Zanke C., Panchuk I.I., Hemleben V. Molecular evolution of 5S rDNA of *Solanum* species (sect Petota): application for molecular phylogeny and breeding // Theor. Appl. Genet. – 2001. – Vol. 103. – P. 1273–1282.
2. Singh D., Ahuja P.S. 5S rDNA gene diversity in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) and its use for variety identification // Genome. – 2006. – Vol. 49. – P. 91–96.

3. Grimm G.W., Denk T. The reticulate origin of modern plane trees (*Platanus*, Platanaceae): A nuclear marker puzzle // Taxon. – 2010. – Vol. 59, № 1. – P. 134–147.
4. Pinhal D., Yoshimura T., Araci C., Martins C. The 5S rDNA family evolves through concerted and birth-and-death evolution in fish genomes: an example from freshwater stingrays // BMC Evol. Biol. – 2011. – Vol 11. – P. 1–14.
5. Morton G., Sprague K. In vitro transcription of a silkworm 5S RNA gene requires an upstream signal // Genetics. – 1984. – Vol. 81. – P. 5519–5522.
6. Череватов О.В., Волков Р.А. Поліморфізм 5S рДНК комах ряду Lepidoptera // Біологічні системи. – 2009. – Т. 1. – С. 7–10.
7. Череватов О.В., Волков Р.А. Організація 5S рибосомальної ДНК *Melitaea trivia* // Цитология и генетика. – 2011. – Т. 45, №2. – С. 62–68.
8. Львовский А.Л., Моргун Д.В. Булавоусые чешуекрылые Восточной Европы. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2007. – 443 с.
9. Sun S., Asling B., Faye I. Organization and expression of the immunoresponsive lysozyme gene in the giant silk moth, *Hyalophora cecropia* // J. Biol. Chem. – 1991. – Vol. 266, №10. – P. 6644–6649.
10. Zimmerman M., Wahlberg N., Descimon H. Phylogeny of euphidrids checkerspot butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae) based on mitochondrial DNA sequence data // Ann. Entomol. Soc. Am. – 2000. – Vol. 93, № 3. – P. 347–355.
11. Lukhtanov V.A., Vila R., Kandul N.P. Rearrangement of the *Agrodiaetus dolus* species group (Lepidoptera, Lycaenidae) using a new cytological approach and molecular data // Insect. Syst. Evol. – 2006. – Vol. 37. – P. 325–334.

12. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии – М.: Мир, 1984. – 479 с.
13. Панчук І.І., Волков Р.А. Практикум з молекулярної генетики. – Чернівці: Рута, 2007. – 120 с.
14. DNASTAR, 1998. MegAlign 3.18 edit. Software distributed by DNASTAR Inc., Madison, WI, USA.
15. Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs // Nucl. Acids Res. – 1997. – Vol. 25. – P. 3389–3402.
16. Qi G.R., Cao G.J., Jiang P., Feng X.L., Gu X.R. Studies on the sites expressing evolutionary changes in the structure of eukaryotic 5S ribosomal RNA // J. Mol. Evol. – 1988. – Vol. 27. – P. 336–340.
17. Xian-Rong G., Nicoghosian K., Cedergren R.J. 5S RNA sequence from the *Philosamia silkworm*: evidence for variable evolutionary rates in insect 5S RNA // Nucleic Acids Res. – 1982. – Vol. 10. – P. 5711–5716.
18. Череватов О.В. 5S рибосомальна ДНК лускокрилих (Lepidoptera): молекулярна організація, еволюція, застосування у таксономії: Дис. ... канд. біол. наук, – Київ, 2011. – 130 с.
19. Череватов О.В., Волков Р.А. Молекулярна організація 5S рибосомальної ДНК *Polyommatus icarus* // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2010. – Т. 8, №2. – С. 271–278.

Представлено І.О. Андрєєвим
Надійшла 06.11.2012

НОВЫЙ СТРУКТУРНЫЙ ПОДКЛАСС 5S РИБОСОМНОЙ ДНК *LYCAENA TITYRUS*

А.В. Череватов, А.П. Статна, Р.А. Волков

Кафедра молекулярной генетики
и биотехнологии
Черновицкий национальный университет имени
Юрия Федьковича
Украина, 58012, Черновцы, ул. Коцюбинского 2
e-mail: roman.volkov@gmail.com

Цель. 5S рДНК относится к классу умеренно повторяющихся последовательностей, которые организованы в виде тандемных повторов. Каждый тандемный повтор состоит из консервативной 5S рРНК кодирующей области и изменчивого межгенного спейсера (МГС), который широко используется для молекулярной систематики. Тем не менее, организация и эволюция 5S рДНК *Lepidoptera* до

сих пор остается плохо изученной. Цель исследования состояла в том, чтобы описать молекулярную организацию 5S рДНК *Lycaena tityrus*. **Методы.** Повторяющиеся единицы 5S рДНК были амплифицированы с помощью ПЦР, клонированы в бактериальный вектор и секвенированы. **Выводы.** Было показано, что МГС 5S рДНК *L. tityrus* имеет длину 60-61 нп и демонстрирует низкий уровень сходства по сравнению с недавно секвенированными последовательностями МГС других видов бабочек. Таким образом, повторяющаяся последовательность 5S рРНК *L. tityrus* принадлежит к новому структурному подклассу Mc.

Ключевые слова: *Lycaena*, Lepidoptera, 5S рДНК, молекулярная эволюция и таксономия.

NOVEL STRUCTURAL SUBCLASS OF *LYCAENA TITYRUS* 5S RIBOSOMAL DNA

O.V. Cherevatov, A.P. Statna, R.A. Volkov

Department of Molecular Genetics and
Biotechnology
Yuri Fedkovych National University of Chernivtsi
Ukraine, 58012, Chernivtsi, Kotsubynski str. 2
e-mail: roman.volkov@gmail.com

Aim. 5S rDNA belongs to the class of moderately repeated sequences that are organized as tandem arrays. Each repeated unit consists of the conservative 5S rRNA coding region and of rapidly evolving intergenic spacer (IGS), which is widely used for molecular taxonomy. However, organisation and evolution of 5S rDNA of Lepidoptera still remains poorly understood. The aim of the study was to describe molecular organisation of 5S rDNA of *Lycaena tityrus*. **Methods.** 5S rDNA repeated units were amplified by PCR, cloned in bacterial vector and sequenced. **Results.** It was shown that the IGS of 5S rDNA of *L. tityrus* has the length of 60-61 bp and demonstrate only low level of sequence similarity compared to recently sequenced IGS of other butterfly species. Accordingly, the sequenced repeats of *L. tityrus* 5S rRNA belong to novel structural subclass Mc.

Key words: *Lycaena*, Lepidoptera, 5S rDNA, molecular evolution and taxonomy.